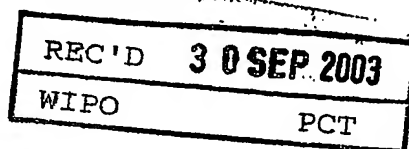


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 39 005.3

**Anmeldetag:** 26. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Bayer Aktiengesellschaft,  
Leverkusen/DE

**Bezeichnung:** Homogene Fluoreszenz-Assay-Methode  
für Kinasen, Phosphatasen und Phospho-  
diesterasen

**IPC:** C 12 Q 1/48

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 30. Mai 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Weihmayr

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Homogene Fluoreszenz-Assay-Methode für Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine homogene Assay-Methode zur quantitativen Messung von Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterase(PDE)-reaktionen. Die Methode kann sowohl in einem direkten, als auch in einem kompetitiven Assay-format angewendet werden.

10 Protein-(De-)Phosphorylierung ist ein allgemeiner regulatorischer Mechanismus, mit dem Zellen selektiv Proteine modifizieren, die regulatorische Signale von außen in den Zellkern vermitteln. Die Proteine, die diese biochemischen Modifikationen ausführen gehören zur Gruppe der Kinasen bzw. Phosphatasen. Phosphodiesterasen hydrolysieren den sekundären Botenstoff cAMP bzw. cGMP und nehmen auf diese  
15 Weise ebenfalls Einfluss auf zelluläre Signaltransduktionswege. Daher dienen diese Enzyme als hochinteressante Zielmoleküle der Pharma- und Pflanzenschutzforschung.

20 Traditionelle Methoden zur Messung des Phosphorylierungszustandes zellulärer Proteine basieren auf den Einbau von radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Die  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten Proteine werden auf einem Gel getrennt und anschließend mit einem Phospho-Imager sichtbar gemacht. Alternativ können phosphorylierte Tyrosinreste durch Bindung von radioaktiv markierten anti-Phosphotyrosin-Antikörpern gebunden und durch Immunoassays z.B. Immunoprecipitation oder Blotting,  
25 nachgewiesen werden. Da diese Methoden radioaktive Isotopen nachweisen müssen, sind sie zeitaufwendig und auch aufgrund der Sicherheitsaspekte im Umgang mit radioaktiven Substanzen nicht für die Hochdurchsatz-Wirkstofffindung (uHTS, ultra high throughput screening) geeignet.

30 Neuere Methoden ersetzen die radioaktiven Immunoassays durch ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay). Diese Methoden verwenden aufgereinigte Substrat-

proteine oder synthetische Peptidsubstrate, die auf einer Substratoberfläche immobilisiert sind. Nach Einwirkung einer Kinase wird das Ausmaß der Phosphorylierung dadurch quantifiziert, indem anti-Phosphotyrosin-Antikörper, die mit einem Verstärkerenzym wie z.B. Peroxidasen gekoppelt sind, an die phosphorylierten immobilisierten Substrate binden.

10 Epps. et al. (US 6 203 994) beschreiben einen Fluoreszenz-basierten HTS-Assay für Protein Kinasen und Phosphatasen, der fluoreszenzmarkierte phosphorylierte Reportermoleküle und Antikörper, die spezifisch die phosphorylierten Reportermoleküle binden, verwendet. Die Bindung wird mittels Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenzquench oder Fluoreszenz Correlations Spektroskopie (FCS) gemessen. Dieses Verfahren hat den intrinsischen Nachteil, dass es nur gute generische Antikörper (z.B. clone PT66, PY20, Sigma) für Phosphotyrosin-Substrate gibt. Es werden nur wenige Beispiele von geeigneten anti-Phosphoserin- bzw. anti-Threonin-Antikörpern berichtet (z.B. Bader B. et al., Journal of Biomolecular Screening, 6, 255  
15 (2001), Panvera-Kit No. P2886). Diese Antikörper haben aber die Eigenschaft, nicht nur Phosphoserin, sondern auch die benachbarten Aminosäuren als Epitop zu erkennen. Es ist aber bekannt, dass Kinasen sehr substratspezifisch arbeiten und sich die Substratsequenzen stark unterscheiden können. Daher sind anti-Phosphoserin-Antikörper nicht als generische Reagenzien einsetzbar.

20 Die Firma Perkin Elmer (Wallac) bietet für Tyrosin-Kinasen einen Assay an, der auf zeitaufgelöster Fluoreszenz und einem Energietransfer von Europium-Chelaten auf Allophycocyanin beruht (s. auch EP 929 810). Auch hier ist das Verfahren durch die Verwendung von Antikörpern im wesentlichen auf Tyrosin-Kinasen beschränkt.

Die Firma Molecular Devices bietet seit kurzem Nanopartikel mit geladenen Metall-Kationen auf der Oberfläche als generisches Bindungsreagenz an, dass für Phosphorylierungsreaktionen sowohl an Tyrosin, als auch an Serin und Threonin geeignet  
30 ist. Die Bindungsreaktion wird aber im stark sauren pH von ca. 5 und bei hoher Ionenstärke durchgeführt. Daher ist für die Bindung der Nanopartikel ein starker

Verdünnungsschritt der Reaktion in den Ziel-Puffer notwendig, was bei Assay-Gesamtvolumina von 10 µl im 1536-Format im uHTS problematisch ist. Die Messung der Bindung geschieht auch hier mittels Fluoreszenzpolarisation.

5 Nikorov schließlich führte polyionische Polymere als Bindungsreagenzien von Phosphorylierungsreaktionen ein. Er beschrieb poly-Aminosäuren wie z.B. poly-Histidin, poly-L-Lysin und poly-L-Arginin (US 6 287 774, Nikorov et al. Anal. Biochem. 278, 206-212 (2000)). Die Erfindung von Nikorov bezieht sich aber ausschließlich auf die Fluoreszenzpolarisation als Meßmethode, die relativ aufwendig ist  
10 und derzeit noch keine parallele Messung einer Mikrotiterplatte (MTP) erlaubt. Daher wären die Messzeiten für eine 1536-MTP sehr hoch und die parallele Messung von Enzymkinetiken nicht möglich. Außerdem ist die Fluoreszenzpolarisation als Methode auf sehr kleine fluoreszente Substrate beschränkt. Auch sind Polyethylenimine als Bindungsreagenzien nicht explizit erwähnt.

15

In der vorliegenden Erfindung wird die Limitation der Beschränkung auf (De)Phosphorylierungsreaktionen am Tyrosin von US 6 203 994 durch die Verwendung von polykationischen Polymeren anstelle von Antikörpern, aufgebrochen. Dadurch wird die Messung von allen Kinase- und Phosphatasereaktionen an Serin,  
20 Threonin und Tyrosin sowie auch die Messung von Phosphodiesterasereaktionen möglich. Während Nikorov (US 6 287 774) mittels Fluoreszenzpolarisation nach dem gegenwärtigen Stand der Technik nicht parallel eine Mikrotiterplatte mit 96, 384 oder gar 1536 Proben messen kann, eröffnet meine Erfindung aufgrund der simplen Messtechnik die parallele Messung sogar von hochzeitaufgelösten Enzymkinetiken.  
25 Darüber hinaus ermöglichen Messungen der Fluoreszenzintensität gegenüber der Fluoreszenzpolarisation eine größere Sensitivität bei kürzeren Messzeiten.

Als weiterer Vorteil gegenüber Nikorov kann das wesentlich billigere und hydrolysestabilere Polyethylenimin verwendet werden

30

**Beschreibung der Erfindung:**

5 In der vorliegenden Erfindung werden polykationische Polymere mit fluoreszenz-  
quenchenden Eigenschaften verwendet, um Kinase-, Phosphase- und Phospho-  
diesterasereaktionen zu messen. Die Assay-Methode beinhaltet keine Waschschr-  
itte und ist perfekt auch für miniaturisierte Assays in Gesamtvolumina von 10 µl und  
weniger geeignet. Das polykationische Polymer, das als universelles und generisches  
Bindungsreagenz für Moleküle mit mindestens einer einfach gebundenen  
Phosphatgruppe dient, kann unmodifiziert oder markiert mit Quencher-Farbstoffen  
10 wie z.B. Dabcyl oder QSY35 eingesetzt werden.

Das direkte Assayformat besteht im wesentlichen aus folgenden Schritten:

- 15 i) Ein fluoreszentes Edukt wird durch eine Kinase-, Phosphatase- oder PDE-  
Reaktion in ein fluoreszentes Produkt umgewandelt, das sich durch min-  
destens eine einfach gebundene Phosphatgruppe vom Edukt unterscheidet.
- 20 ii) Ein polykationisches Polymer, das Quenchergruppen enthält, wird (vor,  
während oder nach der Reaktion) zugegeben und bindet entweder das phos-  
phorylierte fluoreszente Edukt oder das phosphorylierte fluoreszente Produkt.  
Dabei wird die Fluoreszenz des phosphorylierten Eduktes bzw. des phos-  
phorylierten Produktes durch die Quenchergruppen auf dem polykationischen  
Polymer gequencht.
- 25 iii) Der Reaktionsumsatz wird durch Messung der Fluoreszenzintensität und/oder  
der Fluoreszenzlebenszeit quantifiziert. Wenn die Zugabe des polykat-  
ionischen Polymers vor oder während der Reaktion geschieht, kann die  
Kinetik der Reaktion verfolgt werden.

Das kompetitive Assayformat besteht aus folgenden Schritten:

- 30 i) Ein nicht-fluoreszentes Edukt wird durch eine Kinase-, Phosphatase- oder  
PDE-Reaktion in ein nicht-fluoreszentes Produkt umgewandelt, das sich

durch mindestens eine einfach gebundene Phosphatgruppe vom Edukt unterscheidet.

- 5           ii) Ein polykationisches Polymer, das Quenchergruppen enthält, und ein fluoreszentes, phosphoryliertes Reporterreagenz wird (vor, während oder nach der Reaktion) zugegeben. Es entsteht ein Komplex aus dem polykationischen Polymer und dem Reporterreagenz, wenn kein phosphoryliertes Edukt oder phosphoryliertes Produkt vorhanden sind. Dabei wird die Fluoreszenz des phosphorylierten Eduktes bzw. des phosphorylierten Produktes durch die Quenchergruppen auf dem polykationischen Polymer ge-
- 10           quencht. In Gegenwart von entweder phosphoryliertem Edukt oder phosphoryliertem Produkt kompetieren diese mit dem Reporterreagenz um die Bindung an das polykationische Polymer, wodurch der Quench der Fluoreszenz des Reporterreagenz aufgehoben wird.
- 15           iii) Der Reaktionsumsatz wird durch Messung der Fluoreszenzintensität und/oder der Fluoreszenzlebenszeit quantifiziert. Wenn die Zugabe des polykationischen Polymers und des fluoreszenten Reporterreagenz vor oder während der Reaktion geschieht, kann die Kinetik der Reaktion verfolgt werden.

20           **Phosphatase-Assays** werden so konfiguriert, dass ein fluoreszentes phosphoryliertes Substrat-Peptid oder -Protein (1) zunächst von einer Phosphatase dephosphoryliert wird. Im Anschluss an die Reaktion wird das polyionische Polymer (3) hinzugegeben. Ist das Enzym aktiv, so bindet das polyionische Polymer nicht an das fluoreszente dephosphorylierte Substrat (2) und die Fluoreszenz ist ungequencht hoch. Ist das Enzym inaktiv oder inhibiert, so bindet das polyionische Polymer an das fluoreszente phosphorylierte Substrat und quencht die Fluoreszenz des Substrates

25           (Komplex, 4) (s. Abb. 1).

30           **Kinase-Assays** können entweder direkt oder kompetitiv aufgebaut werden. Beim direkten Kinase-Assay wird ein nicht phosphoryliertes fluoreszentes Substrat-Peptid oder -Protein eingesetzt, das mindestens ein Serin oder ein Threonin oder ein Tyrosin enthält. Das polyionische Polymer kann gleich zu Beginn der Reaktion oder

erst nach der Reaktion hinzugegeben werden. Ist die Kinase aktiv, so wird das Substrat phosphoryliert und vom polyionischen Polymer gebunden, wobei die Fluoreszenz des Substrates gequencht wird. Ist die Kinase inhibiert oder inaktiv, so bleibt die Fluoreszenz des Substrates hoch (s. Abb. 2). In einem kompetitiven Kinase-Assay wird neben einem nicht fluoreszentem Substrat-Peptid oder -Protein (5) ein fluoreszentes phosphoryliertes Peptid od. Protein (Reporterreagenz, 7) eingesetzt, das von dem polyionischen Polymer gebunden wird wobei die Fluoreszenz des Reporterreagenz gequencht wird. Das Polymer kann zu Beginn oder nach der Enzymreaktion zugesetzt werden. In dem Maße, wie das Substrat phosphoryliert wird (6), konkurriert es zunehmend mit dem Reporterreagenz um die Bindung an das polyionische Polymer (Komplex, 8). Folglich wird immer weniger Reporterreagenz von dem polyionischen Polymer gebunden und die Fluoreszenz des Reporterreagenz weniger gequencht (s. Abb. 3).

Ähnlich wie Kinase-Assays können auch **Phosphodiesterase-Assays** direkt oder kompetitiv konfiguriert werden. Im direkten Modus wird ein fluoreszentes cAMP- oder cGMP-Derivat (9) verwendet, das von dem polyionischen Polymer nicht gebunden wird. Es findet dann kein Quench der Fluoreszenz statt. Sobald die zyklischen Nukleotid-Derivate hydrolysiert werden und damit eine einfach gebundene Phosphatgruppe entsteht, bindet das polyionische Polymer das entstandene fluoreszente Nukleotidmonophosphat (10) und quencht dessen Fluoreszenz (Komplex, 11) (s. Abb. 4). Im kompetitiven Modus wird analog zum kompetitiven Kinase-Assay ein fluoreszentes phosphoryliertes Reporterreagenz (7) und nicht fluoreszente cAMP- bzw. cGMP-Derivate (12) eingesetzt. Ist die Phosphodiesterase aktiv, so entsteht Nukleotidmonophosphat (13), das mit dem Reporterreagenz um die Bindung an das polyionische Polymer konkurriert, d.h. die Fluoreszenz des Reporterreagenz wird nicht mehr gequencht. Ist das Enzym inhibiert oder inaktiv, so bindet das polyionische Polymer an das Reporterreagenz und quencht dessen Fluoreszenz (s. Abb. 5).

Das Messprinzip in allen vorgestellten Assayvarianten beruht auf dem Quenchen der

Fluoreszenz eines Substrates oder eines Reporterreagenz. Der Mechanismus des Fluoreszenzquenches kann z.B. ein Förster-Energietransfer auf einen nicht fluoreszierenden Farbstoff sein. Dadurch wird auch die Fluoreszenzlebenszeit beeinflusst, so dass die Bindung des polyionischen Polymers an das fluoreszente Substrat bzw. Reporterreagenz auch mittels Messung der Fluoreszenzlebensdauer gemessen werden kann. Eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer kann auch dann gemessen werden, wenn der Fluorophor F sich genügend nahe an der phosphorylierten Aminosäure befindet, an der das polyionische Polymer bindet. In diesem Fall ist es nicht notwendig, dass das Polymer mit Quencherfarbstoffen markiert ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine homogene Assay-Methode für Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen durch direkte Unterscheidung von Edukten und Produkten der Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterasereaktionen bestehend aus folgenden Schritten:

- a) Das Substrat von Kinasereaktionen besteht aus einem fluoreszentem Peptid bzw. einem fluoreszentem Protein, das mindestens ein Serin oder mindestens ein Threonin oder mindestens ein Tyrosin enthalten muss, das von der Kinase phosphoryliert werden kann.

Das Substrat von Phosphatasereaktionen besteht aus einem fluoreszentem Peptid bzw. einem fluoreszentem Protein, das mindestens ein phosphoryliertes Serin oder mindestens ein phosphoryliertes Threonin oder mindestens ein phosphoryliertes Tyrosin enthalten muss, das von der Phosphatase dephosphoryliert werden kann.

Das Substrat einer Phosphodiesterase ist ein fluoreszentes cAMP- oder cGMP-Derivat, das durch die Phosphodiesterase in das entsprechende AMP- bzw. GMP-Derivat mit freier Phosphatgruppe überführt wird.

- b) Durch Zugabe von unmodifizierten oder mit Quencherfarbstoffen modi-



5       fizierten polykationischen Polymeren, die selektiv das Edukt oder das Produkt der Enzymreaktion, das mindestens eine einfach gebundene Phosphatgruppe enthält, binden und dabei die Fluoreszenz des gebundenen Eduktes oder Produktes quenchen, wird zwischen Edukt und Produkt von Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterasereaktionen unterschieden.

c)     Die Bindung der polykationischen Polymere kann durch Fluoreszenzmessungen detektiert werden.

10     Alternativ: können die Kinase- und Phosphodiesterase-Assays auch kompetitiv konfiguriert werden:

15     Das Substrat von Kinasereaktionen besteht aus einem nicht fluoreszentem Peptid bzw. einem nicht fluoreszentem Protein, das mindestens ein Serin oder mindestens ein Threonin oder mindestens ein Tyrosin enthalten muss, das von der Kinase phosphoryliert werden kann.

20     Das Substrat einer Phosphodiesterase ist ein nicht fluoreszentes cAMP- oder cGMP-Derivat, das durch die Phosphodiesterase in das entsprechende AMP- bzw. GMP-Derivat mit freier Phosphatgruppe überführt wird.

      Zusätzlich wird ein mindestens einfach phosphoryliertes fluoreszentes Peptid bzw. Protein (Reporterreagenz) hinzugegeben, an das das polykationische Polymer bindet.

25     Durch Zugabe von unmodifizierten oder mit Quencherfarbstoffen modifizierten polykationischen Polymeren wird das Reporterreagenz gebunden und dessen Fluoreszenz gequencht. In dem Maße, wie durch die Kinase- bzw. Phosphodiesterasereaktion Produkt entsteht, das mindestens eine einfach gebundene Phosphatgruppe enthält, konkurriert dieses phosphorylierte Produkt mit dem Reporterreagenz um die Bindung  
30     an das polykationische Polymer. Dadurch wird die Bindung des Reporterreagenz an das polykationische Polymer aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporterreagenz

steigt wieder auf den ungequenchten Wert.

Die Bindung der polykationischen Polymere kann durch Fluoreszenzmessungen detektiert werden.

**Beispiele:**

- 1) Darstellung des Konjugates aus Dabcyl und Polyethylenimin (PEI880-Dabcyl):

Material: Polyethylenimin (PEI880), Fluka No. 03880, MW ca. 600-1000 kDa  
4-((4-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure-succinimidylester  
(Dabcyl-SE),  
Molecular Probes, No. D-2245  
NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma, No's 6329, 6392  
Hydroxylamin-Hydrochlorid,  
10 M NaOH  
Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, No. 41640  
Sephadex G-25 NAP-10 Säulen, Pharmacia

Durchf.: Carbonat-Puffer pH 9.0, 1M:  
10 ml 1M NaHCO<sub>3</sub>  
+ 2.5 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Kopplung von Dabcyl an PEI880:

100 µl 0.15 g/ml PEI880, pH 7.0  
+100 µl 1M Carbonat-Puffer pH 9.0  
+600 µl H<sub>2</sub>O  
+200 µl Dabcyl-SE-Lösung 10 mg/ml in DMSO (frisch gelöst)

Der Reaktionsmix wird 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 100 µl 1.5 M Hydroxylamin pH 8.5 und 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln gestoppt. Anschließend wird das PEI880-Dabcyl-Konjugat von überschüssigem Dabcyl-Farbstoff durch Gelfiltration auf einer NAP-10-Säule abgetrennt.

Ergebnis: Die erste orange Bande der chromatographischen Aufreinigung stellte das Produkt, Dabcyl-markiertes PEI880 dar. Überschüssiges und desaktivierte ..... ???

5 Ebenfalls oranger Dabcyl-Farbstoff blieb auf der Säule zurück.

2) Ionenstärkeeinfluss auf die Bindung eines Phosphoserin-Peptides an PEI880-Dabcyl

10 Material: Fluorescein-(GRPRTPSSFAEG) (Tracer), Panvera, Kit No. P2886  
PEI880-Dabcyl-Konjugat

Durchf.: Je 10 nM Tracer und 0.6  $\mu$ M PEI880-Dabcyl-Konjugat wurden in HEPES-Puffer pH 7.5 in Gegenwart von 0, 150 mM und 1 M NaCl jeweils mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden mit einem Igel-Pipettierer (Cybio) auf 1536-Mikrotiterplatten pipettiert. In einem Tecan Ultra wurde abschließend die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenz-  
15 polarisation simultan gemessen.

20 Ergebnis: Ohne NaCl wurde die Fluoreszenz des Tracers gequencht, bei höherer Ionenstärke fand kein Quench statt. Messungen der Fluoreszenz-  
polarisation zeigten nur bei 150 mM und 1 M NaCl keine Erhöhung, was gleichzeitig belegte, dass unter den Bedingungen keine Bindung  
25 zwischen Tracer und Polymer stattfand. Das ist ein Beleg für den ionischen Charakter der Bindung.

3) Bindung eines fluoreszenten Phosphotyrosin-Peptides an PEI880-Dabcyl:

30 Material: Fluorescein-C6-TEGQpYQPQP (F1-P1), Synthese Eurogentec  
PEI880-Dabcyl-Konjugat

Durchf.: Je 10 nM Fl-P1 wurden in Gegenwart von 150 mM NaCl in 50 mM HEPES-Puffer pH 7.5 mit PEI880-Dabcyl-Konzentrationen von 10 pM bis 120 µM jeweils mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden mit einem Igel-Pipettierer (Cybio) auf 1536-Mikrotiterplatten pipettiert. In einem Tecan Ultra wurde abschließend die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzpolarisation simultan gemessen.

5

Ergebnis: Auch das Phosphotyrosin-Peptid Fl-P1 wird von PEI880-Dabcyl gebunden. Wie beim Phosphoserin-Peptid (Bsp. 2) steigt bei Bindung die Polarisation an, während gleichzeitig die Fluoreszenz von Fl-P1 gequencht wird.

10

**Patentansprüche**

1. Homogene Assay-Methode zur quantitativen Messung von Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterase(PDE)-reaktionen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Kinase, Phosphatase oder Phosphodiesterase mit einem fluoreszenten, phosphorylierbaren oder dephosphorylierbaren Substrat in Anwesenheit eines polykationischen Polymers, das Quenchergruppen enthält, reagieren lässt und die Veränderung der Phosphorylierung durch die Änderung der Fluoreszenz bestimmt.
2. Assay Methode nach Anspruch 1 wobei das polykationische Polymere Polyethylenimine, Polyarginine, Polylysine und/oder Polyhistidine ist.
3. Assay Methode nach Anspruch 1 wobei der Quencher Dabcyl, QSY35 oder ein anderer zum Energietransfer geeigneter Farbstoffe ist, der nicht selbst fluoresziert.
4. Assay Methode nach Anspruch 1 wobei der Fluoreszenz-Label Fluorescein, EDANS, Rhodamine, Cy5, EvoBlue-Farbstoffe, Coumarine und/oder Alexa-Farbstoffe ist.
5. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 4 wobei die Messung kinetisch erfolgt.
6. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 4 wobei die Messung in einer Mikrotiterplatte parallel/simultan erfolgt.
7. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 6 wobei die Änderung der Fluoreszenz entweder die Änderung der Fluoreszenzintensität oder die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit ist.

8. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 7 wobei die Messung zur Auffindung von Wirkstoffen verwendet wird, die die untersuchte Kinase-, Phosphatase- oder Phosphodiesterase-Reaktion beeinflussen.

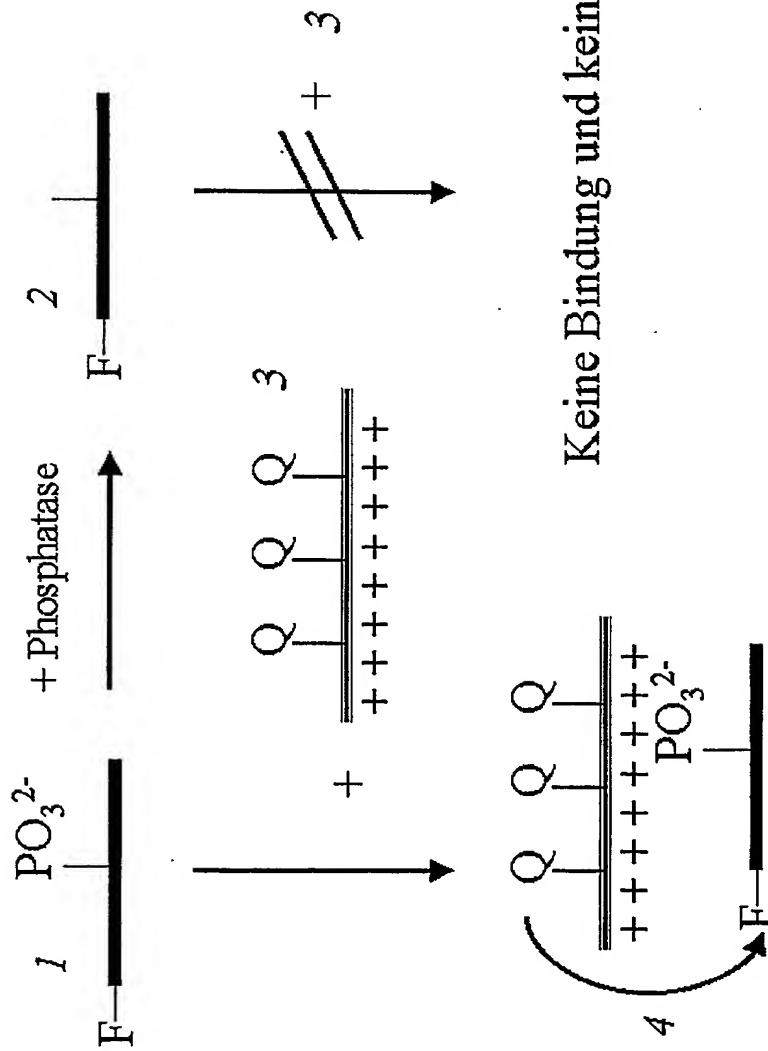
**Homogene Fluoreszenz-Assay-Methode für Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen**

**Z u s a m m e n f a s s u n g**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine homogene Assay-Methode zur quantitativen Messung von Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterase(PDE)-reaktionen. Die Methode kann sowohl in einem direkten, als auch in einem kompetitiven Assayformat angewendet werden.



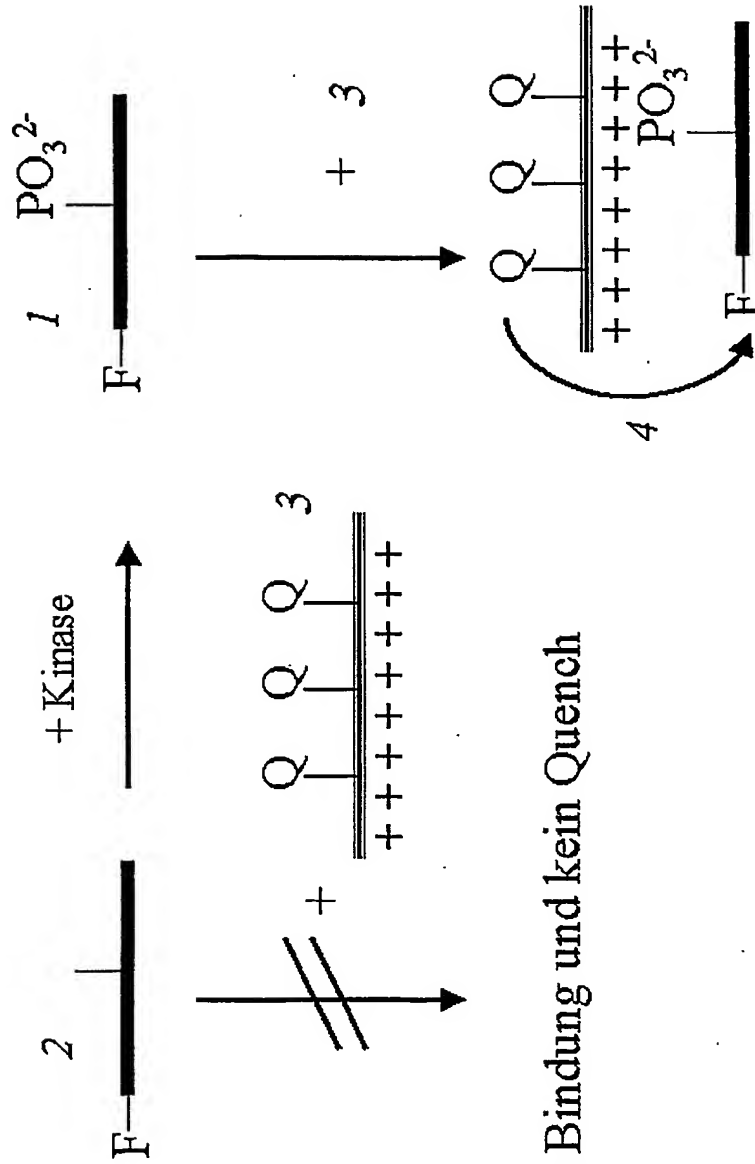
Abb. 1:



Bindung und Quench von  $F^-$

Keine Bindung und kein Quench

Abb. 2:

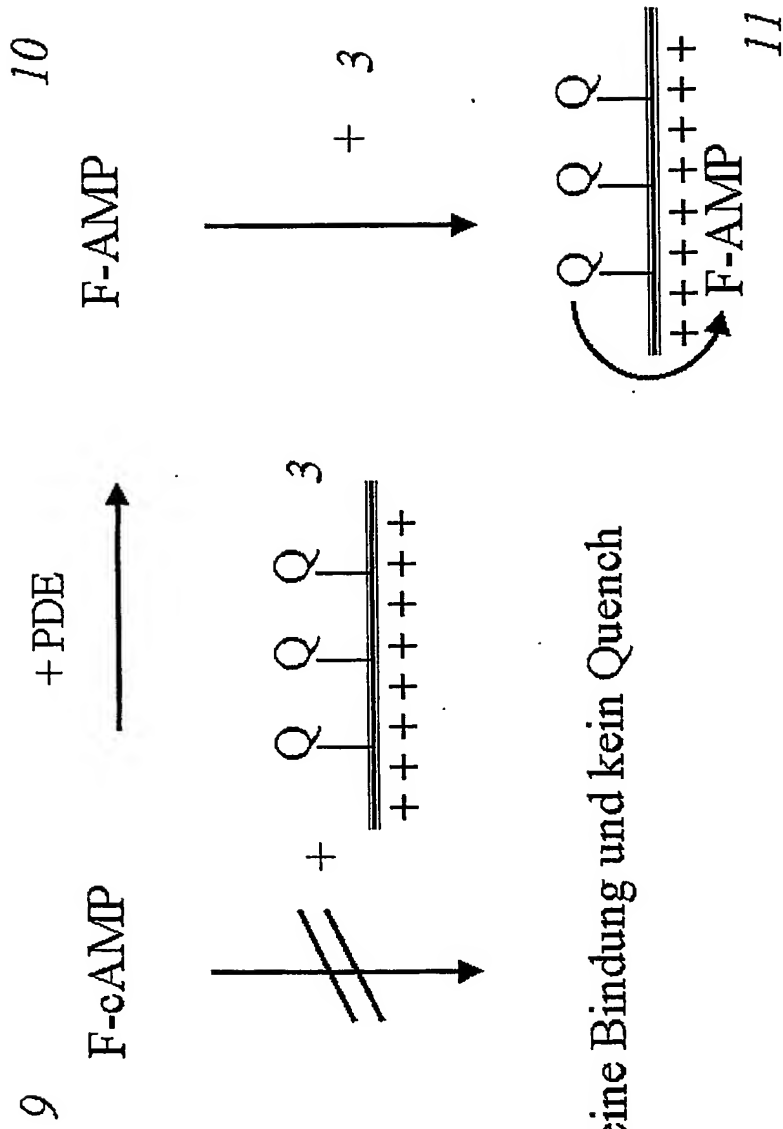


Keine Bindung und kein Quench

Bindung und Quench von F

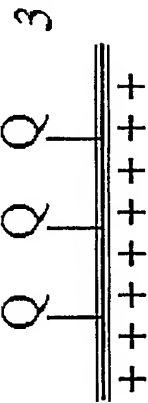


Abb. 4:



Keine Bindung und kein Quench

Bindung und Quench von F



Keine Konkurrenz zwischen 12 und 7

Kompetition von 13 und 7  
Keine Bindung von 3 und  
sowie kein Quench von F